

① BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

② Offenlegungsschrift  
③ DE 31 22 926 A 1

⑤ Int. Cl. 3:  
A61L 15/01

④ Aktenzeichen:  
⑥ Anmeldetag:  
⑦ Offenlegungstag:

P 31 22 926.3  
10. 6. 81  
22. 7. 82

⑧ Unionspriorität: ⑨ ⑩ ⑪

30.06.80 US 164821

20.04.81 US 255953

⑫ Erfinder:

Athuler, John H., Englewood, Col., US

⑬ Anmelder:

Medical Devices, Inc., Englewood, Col., US

⑭ Vertreter:

Schulze, I., Dipl.-Chem.; Gutscher, E., Dipl.-Ing., Pat.-Anw.,  
6900 Heidelberg

⑮ Gerinnungsmittel und Gerinnungsmittel enthaltendes gebrauchsfertiges Verbandzeug

Es wird ein Gerinnungsmittel aus Thrombin und weiteren als Konservierungsmittel dienenden Bestandteilen in einer Salzlösung sowie eine lagerfähige Fertigpackung des Gerinnungsmittels in Form eines gebrauchsfertigen Verbandzeugs beschrieben, das zur lokalen Anwendung auf Wunden dient und auf deren Oberfläche eine Gerinnung des Blutes bewirkt. Eine gebrauchsfertige Bandage oder ein anderes Verbandzeug wird mit der Lösung getränkt und gesättigt, in einer Hülle versiegelt und gelagert, ohne daß die Lösung ihre aktiven Eigenschaften gegenüber Fibrinogen im Blut verliert, wenn sie mit dem Verbandzeug auf eine Wunde oder einen Wundschnitt aufgelegt wird.

(31 22 926)

DE 31 22 926 A 1

DE 31 22 926 A 1

3122926

Nummer:

3122926

Int. Cl. 3:

A61L 15/01

Anmeldetag:

10. Juni 1981

Offenlegungstag:

22. Juli 1982

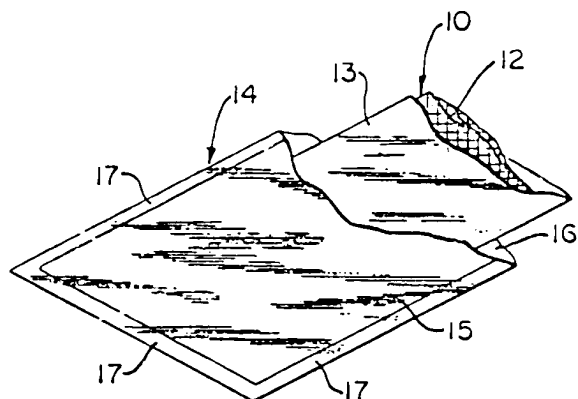


FIG 1

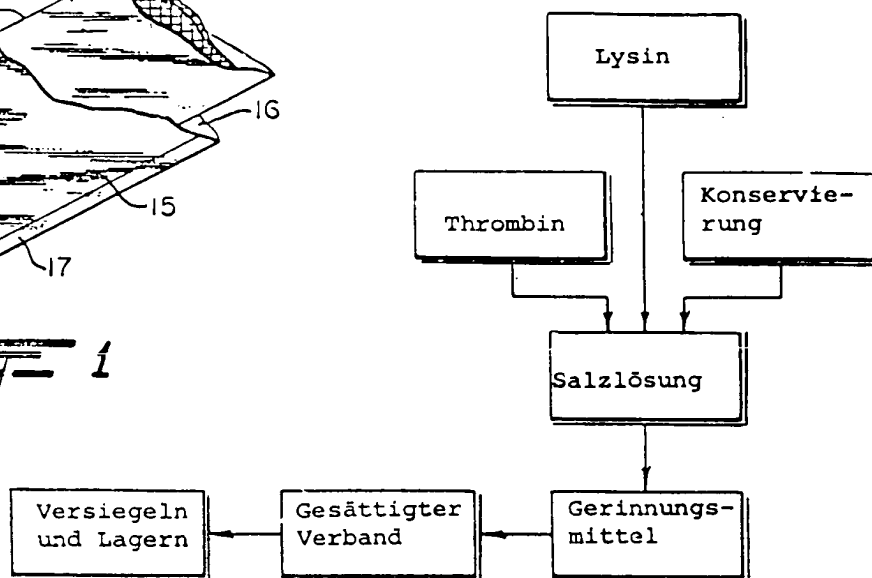
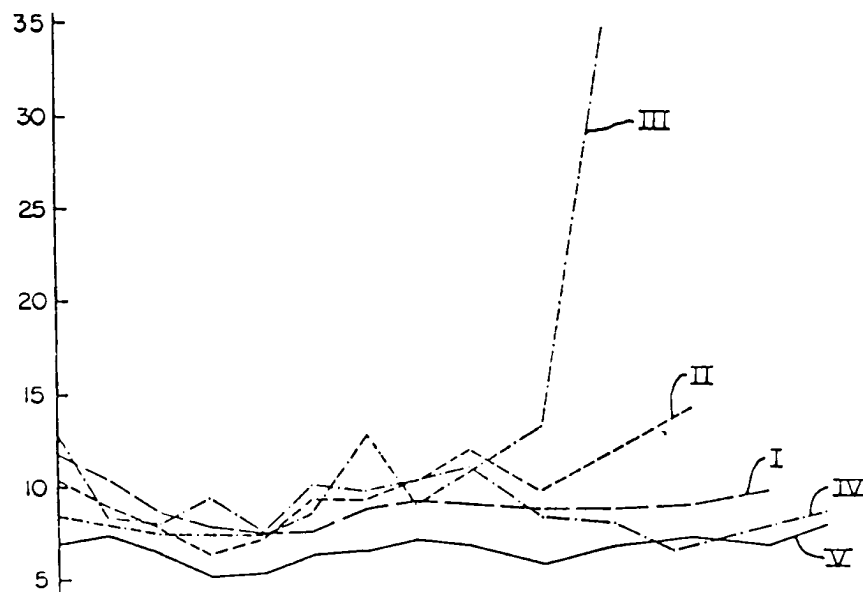


FIG 2



40°C  
FIG 3

3122926

Patentanwältin  
Dipl.-Chem. I. **SCHULZE**  
Dipl.-Ing. **E. GUTSCHER**

Galsbergstraße 3  
6800 HEIDELBERG 1  
Telephon 06221/23260

— Abs. Dipl.-Chem. I. Schulze, Dipl.-Ing. E. Gutscher, Patentanwältin  
Galsbergstraße 3, 6800 Heidelberg 1

UNSER ZEICHEN: 3821  
IHR ZEICHEN:

Anmelder: Medical Devices, Inc.  
7346 South Alton Way  
Englewood, Colorado

Gerinnungsmittel und Gerinnungs-  
mittel enthaltendes gebrauchsfertiges  
Verbandszeug

# P A T E N T A N S P R Ü C H E =====

1. Gerinnungsmittel zur Verwendung als Verbandszeug für Wunden,

eines vollhydroxylierten, geradkettigen, 3 bis 6 Kohlenstoff-

3122926

10.06.81

- 2 -

atome enthaltenden mehrwertigen Alkohol enthält.

2. Gerinnungsmittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Lösung eine schwefelfreie ätherische Aminosäure in molaren Mengen von 0,01 bis 0,25 enthält.
3. Gerinnungsmittel nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Aminosäure Lysin ist.
4. Gerinnungsmittel nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Lösung eine Kombination von Glycerin und Lysin enthält.
5. Gerinnungsmittel nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Lösung 0,1 bis 4,0 Gew.-% eines Polyethylenglykols mit einem Molekulargewicht von 2500 bis 6000 enthält.
6. Gerinnungsmittel nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Lösung Glycerin, Lysin und Polyethylenglykol enthält.
7. Gerinnungsmittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Lösung 30 Vol-Teile Glycerin enthält.
8. Gebrauchsfertige, lagerfähige Packung eines Gerinnungsmittels gemäss einem oder mehrerer der Ansprüche 1 bis 7, in Form einer Bandage, Kompresse, oder eines anderen Verbandszeugs zum Aufbringen auf eine Wunde, dadurch gekennzeichnet, dass ein absorbierendes Material (12) mit einer Lösung aus  
  
aus getrankte Material in einer Hülle (4) hermetisch versiegelt ist.

3122926

10.08.81

- 3 -

9. Packung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Thrombin in einer Menge von 25 bis 250 Einheiten/cm<sup>3</sup>, bezogen auf das getränkte Material vorhanden ist.
10. Packung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass eine schwefelfreie, ätherische Aminosäure in molaren Mengen von 0,01 bis 0,25 vorhanden ist.
11. Packung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das absorbierende Material mit einer Lösung getränkt ist, die Lysin enthält.
12. Packung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das absorbierende Material mit einer Lösung getränkt ist, die Glycerin und Lysin enthält.
13. Packung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das absorbierende Material mit einer Lösung getränkt ist, die 0,1 bis 4,0 Gew.-% Polyethylenglykol mit einem Molekulargewicht im Bereich von 2500 bis 6000 enthält.
14. Packung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass das absorbierende Material mit einer Lösung getränkt ist, die Glycerin, Lysin und Polyethylenglykol enthält.
15. Packung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass das absorbierende Material mit einer Lösung getränkt ist, die Glycerin in einer Menge von etwa 30 Vol.-Teilen, bezogen auf die Lösung, enthält.

entw. des absorbierenden Materials enthält.

Beschreibung  
=====

Die Erfindung betrifft Koagulierungs- oder Gerinnungsmittel und sie betrifft insbesondere vorgefertigtes und verpacktes Verbandzeug oder verpackte absorbierende Kompressen, die mit einer Gerinnungsmittellösung gesättigt sind und diese  
5 Lösung beim Auflegen des Verbandzeugs oder der Komresse auf eine Wunde, das Blut zuverlässig und wirksam zur Gerinnung bringt.

Vorbehandelte Bandagen, Kompressen oder Läppchen, mit denen aus Wunden, Schnitten, Kratzern und dergleichen austretendes  
10 Blut gestillt wird, sind bekannt. Bei den herkömmlichen Verfahren wird im allgemeinen eine Lösung aus einem Gerinnungsmittel mit oder ohne Zusatz eines keimtötenden oder antiseptischen Mittels hergestellt. Mit dieser Lösung wird eine Kom-  
15 presse oder ein Gaze-Streifen am Verbandzeug getränkt und gesättigt. Die US-PS 2 579 367 beispielsweise beschreibt die Herstellung einer Bandage, bei der auf den zu behandelnden Bereich der Bandage zunächst eine eiweisshaltige Lösung oder Paste und anschliessend ein Protein-Gerinnungsmittel aufgebracht wird, das in eine halbdurchlässige, künstliche Kruste  
20 umgewandelt wird. Das hier vorgeschlagene Protein-Gerinnungsmittel besteht aus ausgewählten Metallsalzen, beispielsweise wasserlösliche Salze von zweiwertigem Zink, Mangan und Kobalt, insbesondere Zinkacetat, Kobaltschwefel und Mangansulfat. Diese Zubereitung soll auf Wundgaze oder Verbandmull aufgebracht werden. Nach dem Trocknen soll die Gaze oder der Ver-

band, das getrocknet worden ist, mit der Paste mit dem Metal-

salz des Verbandes reagiert, um ein Metallcaseinat zu bilden. Andererseits wurde auch bereits vorgeschlagen, verschiedene Arten von Verbänden oder Kompressen zu verwenden, die mit einem Gerinnungsmittel behandelt waren, wie beispielsweise  
5 in den US-PSen 2 442 111; 3 731 583; 3 342 183; 3 317 376 und 3 328 259 beschrieben ist. Es wurde aber bisher kein wirksames Verfahren zur Herstellung einer Fertigpackung eines Gerinnungsmittels entwickelt, die bei richtiger Lagerung als gebrauchsfertiger Verband oder Kompressen verwen-  
10 det und auf eine Wunde aufgebracht werden kann, um das Fibrinogen im Blut wirksam in ein Fibringerinnsal umzuwandeln.

Wie wichtig es aber ist, unmittelbar auf das Fibrinogen einzuwirken wird deutlich, wenn man den Mechanismus der Blutgerinnung betrachtet. Ganz allgemein gilt, dass der unver-  
15 änderte Gerinnungsfaktor, bekannt als ein Proenzym, in ein aktives Enzym umgewandelt wird, das seinerseits in der Lage ist, tausende von Substratmolekülen in aktive Enzyme zu verwandeln. Dabei wird eine Kettenreaktion in Gang gesetzt, wobei die Aktivierung eines einzigen Proenzym-Moleküls zur  
20 Aktivierung des gesamten Gerinnungsmechanismus führen kann. Andererseits wirkt das fibrinolytische System im Körper dem Gerinnungsvorgang entgegen und hält ein Gleichgewicht zwischen Gerinnungsbildung und Gerinnungsauflösung. Beim fibrinolytischen System werden eine Reihe von Proenzymen, wenn  
25 sie aktiviert werden, in Enzyme verwandelt, die in der Lage sind, Blutgerinnsel aufzulösen. Ein solches lytisches Enzym wird als Plasmin bezeichnet. Es können jedoch mehrere Faktoren auftreten, um das Gleichgewicht zwischen Gerinnselbil-

in Betracht zu ziehen, die die Kettenreaktion oder die Reihenfolge bei der Gerinnung unterbrechen. Es ist aber wichtig,

zu erkennen, dass es besonders erwünscht ist, die Gerinnungswirkung in einer unteren Stufe der Reihenfolge oder der Kettenreaktion in Gang zu setzen. Sie soll vorzugsweise unmittelbar an der Seite der Wunde auftreten, so dass die  
5 Reihenfolge des Gerinnungsvorgangs nicht durch andere störende Faktoren unterbrochen wird. Wenn dies erreicht wird, wird das Risiko auf ein Minimum verringert, nämlich, dass das Gerinnungsmittel in den Blutstrom eintritt. Es wird bewirkt, dass das Blut sehr schnell und oberflächlich an der Seite der  
10 Wunde gerinnt.

Thrombin ist eine sterile Proteinsubstanz, die aus Prothrombin durch Einwirkung von Thrombokinase, gewöhnlich in Gegenwart von Calcium, hergestellt wird. In konzentrierter Form hat es eine starke Gerinnungswirkung auf das Blut, insbesondere  
15 beim Koagulieren von Fibrinogenplasma, das es in ein Fibringerinnsel verwandelt. Üblicherweise ist Thrombin im Handel in Form eines Pulvers erhältlich, das mit geringen Mengen anderer Bestandteile gemischt ist, wie Natriumchlorid, Calciumchlorid, Glycin und Benzethoniumchlorid, um etwas zur Konservierung beizutragen, wenn das Thrombin in Trocken- oder  
20 Pulverform gelagert wird. Thrombin wurde früher in Form einer Lösung unmittelbar auf Schnittwunden oder Verletzungen aufgetragen oder in Kombination mit anderen blutstillenden Mitteln verwendet, beispielsweise einem absorbierbaren Gelatine-Schwamm  
25 der nach dem Verschliessen eines chirurgischen Schnittes aufgelegt und dann allmählich während einer längeren Zeitspanne absorbiert wird. Es wurde aber keine zufriedenstellende Methode oder eine zufriedenstellende Thrombin-Zubereitung bekannt, die in Form einer Lösung verpackt, versie-

bei der Erfindung der Konservierung von Thrombin beschrieben, das in einer Zuckerlösung aufbewahrt und in



dieser Form zusammen mit einer Salzlösung auf ein blutendes Gewebe aufgebracht oder aufgesprüht werden kann. Diese Veröffentlichung zeigt aber vor allem die Probleme, die bei der Konservierung von Thrombin auftreten und ausserdem macht  
5 die Zuckerlösung das Thrombin nicht zu einer Gerinnungssubstanz, die gebrauchsfertig verpackt werden kann.

Eine wesentliche Schwierigkeit besteht darin, ein Produkt zu schaffen, das sich für den Handel eignet. Es muss über eine entsprechende und ausreichende Zeitspanne lagerfähig sein,  
10 und zwar unter Temperaturbedingungen, denen ein vorverpacktes Gerinnungsmittel gegebenenfalls ausgesetzt werden kann.

Es ist Aufgabe der Erfindung, ein neues und verbessertes Blutgerinnungsmittel zu schaffen, das in Form einer gebrauchsfertigen Packung verpackt und gelagert und als Fertigpackung auf einen Wundschnitt oder eine Wunde, entweder äusserlich oder innerlich aufgebracht werden kann, wobei das als  
15 Lösung in einer Bandage, einer Kompresse oder einem anderen Verbandzeug enthaltene Thrombin seine Wirkung als Blutgerinnungsmittel beibehält und beim Aufbringen des Verbandzeugs auf die Wunde das Blut zum Gerinnen bringt, das Verbandzeug gleichzeitig ein Schutz gegen Fremdkörper ist, aber auch leicht von der Haut wieder gelöst werden kann, ohne die Wunde wieder aufzureissen. Dabei soll die Thrombinlösung in der  
20 Fertigpackung während der Lagerung aktiv bleiben und das  
25 Thrombin seine Wirkung nicht verlieren.

Das fertig verpackte Gerinnungsmittel ist so zusammengesetzt, dass es sowohl für eine schnelle auch auch für eine wirksame

Verwendung in Kompressen und dergleichen, das mit der erfindungsgemässen Lösung des Gerinnungsmittels imprägniert ist,  
30 eignet sich besonders da, wo Blut an der Körperoberfläche,

3122926  
- 8 -

10.08.81

beispielsweise auf einer Wunde oder einem Wundschnitt, zum Gerinnen gebracht werden soll. Die erfindungsgemässe Zubereitung besteht aus einer geringen aber wirksamen Menge Thrombin gelöst in einer Salzlösung, der Konservierungsmittel zugegeben wird oder wurde.

Das wichtigste Konservierungsmittel ist ein geradkettiger, 3 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltender, vollständig hydroxylierter mehrwertiger Alkohol, wie Glycerin, Mannit und Sorbit. Zweckmässig wird mindestens eine schwefelfreie ätherische Aminosäure als zusätzliches Konservierungsmittel und wahlweise ein Polyethylenglykol, vorzugsweise mit einem Molekulargewicht im Bereich von 2500 bis 6000, zugegeben.

Der Natriumchloridgehalt der Gerinnungsmittellösung ist annähernd isotonisch und verhindert das Reißen roter Blutkörperchen, wenn die Lösung auf die Wunde gebracht wird.

Eine Bandage oder ein Verbandmull wird mit der Lösung gesättigt und dicht verschlossen bzw. versiegelt. Dabei kann dieses Verbandzeug in ein verschweisstes Behältnis oder eine verschweiszbare Packung eingelegt, dann versiegelt und vorzugsweise bei tieferer Temperatur, beispielsweise 2° bis 8° C, unter Kühlbedingungen gelagert werden, um eine maximale Lagerzeit sicherzustellen. Die Bandage, die Wundgaze, der Verbandmull oder jedes andere Verbandzeug kann aus dem Behältnis oder der Packung entnommen und direkt auf die Wunde oder den Wundschnitt aufgelegt werden, ohne dass irgendeine besondere Zurichtung oder Aktivierung des Gerinnungsmittels erforderlich

bei einer bevorzugten erfindungsgemässen Ausführungsform wird Thrombin in einer Salzlösung zusammen mit Lysin, Glycerin

und Polyethylenglykol gelöst. Eine gebrauchsfertige Bandage wird mit dem so hergestellten Gemisch getränkt und gesättigt, versiegelt und für späteren Gebrauch gelagert. Bei dieser Ausführungsform sind Lagerzeit und Wirksamkeit des Thrombin

5 wesentlich erhöht, und zwar durch die kombinierte Konservierungswirkung von Glycerin, Polyethylenglykol und Lysin.

Bei einer anderen Ausführungsform wird Thrombin mit Lysin und Glycerin kombiniert und mit einer Salzlösung sorgfältig gemischt.

10 Diese Lösung wird unmittelbar nach der Herstellung auf eine Bandage, eine Wundgaze oder einen Verbandmull aufgebracht und dieses Verbandzeug mit der Lösung gesättigt. Das so vorgefertigte, gebrauchsfertige Verbandzeug wird in eine Hülle oder ein anderes versiegelbares Behältnis eingebracht, in diesem

15 dicht eingeschlossen und kühl gelagert, um das Verdampfen der Lösung zu verhindern oder weitgehend zu verringern und das Thrombin in seinem wirksamen Zustand zu erhalten.

Die Erfindung wird anhand der Zeichnungen näher erläutert.  
Es zeigen:

- 20 Fig. 1 eine perspektivische Ansicht einer vorgefertigten Bandage in einer versiegelbaren Hülle;
- Fig. 2 einen Ablaufplan der Verfahrensstufen bei der Herstellung einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemässen vorgefertigten und gebrauchsfertig
- 25 verpackten erfindungsgemässen Gerinnungsmittels;  
und
- Fig. 3 eine graphische Darstellung, die einen Vergleich der

3122926<sub>0</sub> -

10.08.81

Die erfindungsgemässe Gerinnungslösung besteht aus 50  
bis 2000 Einheiten/pro ml, vorzugsweise von 10 bis 1000  
Einheiten Thrombin/ml, Gerinnungslösung und geringen Mengen  
einer schwefelfreien ätherischen Aminosäure, einer Polyhy-  
5 droxy-Verbindung und gegebenenfalls Polyethylenglykol.

Die Salzlösung des Gerinnungsmittels kann eine Endkonzentra-  
tion von 0,50 bis 0,95 Gew.-% Natriumchlorid enthalten.

Wie bereits erwähnt ist die verdünnte Salzlösung des Ge-  
rinnungsmittels in der Salzkonzentration isotonisch oder  
10 nahezu isotonisch, um unnötiges Zerstören roter Blutkörperchen  
an der Wundstelle zu vermeiden.

Die Aminosäure kann in fester Form in 0,01 bis 0,25 molarer  
Konzentration zugegeben werden. So kann beispielsweise L-Lysin  
in einer Menge von 0,05 molar, oder 0,91325 g/100 ml Ge-  
15 rinnungslösung verwendet werden.

Das erfindungsgemässe Gerinnungsmittel eignet sich aber auch  
zur Anwendung im Körperinneren eines Patienten, so beispiels-  
weise einer blutenden Wunde im Mund. Bandagen oder Kompressen,  
die mit der Gerinnungslösung imprägniert sind, können zum  
20 Stillen des Blutes nach einer Zahnextraktion oder anderen  
chirurgischen Eingriffen im Mund verwendet werden. Bei einer  
solchen Behandlung besteht die Möglichkeit, dass eine geringe  
Menge der Gerinnungslösung aus dem Verband geschluckt wird.  
Daher ist es erforderlich, dass Konservierungsmittel verwen-  
25 det werden, die im allgemeinen für Lebensmittel als unbedenk-  
lich gelten. Dazu gehört auch die Verwendung von nur ätheri-  
schen Aminosäuren, die keine Schwefelbestandteile aufweisen.

gegeben.

- Eine begrenzte Zahl von benetzenden Polyhydroxy-Verbindungen sind für die erfindungsgemässe Gerinnungsmittel-Zubereitung vorgesehen, nämlich die geradkettigen  $C_3$ - $C_6$  vollständig hydroxylierten mehrwertigen Alkohole, vorzugsweise Glycerin,
- 5 und die Zuckeralkohole mit 6 Kohlenstoffatomen. Mannit, Sorbit und deren Gemische gehören zu den bevorzugten mehrwertigen Alkoholen. Der Gehalt an solchen Alkoholen beträgt 10 bis 50 Gew.-% der Gerinnungslösung. Glycerin, der bevorzugte mehrwertige Alkohol, scheint dem Verbandzeug Eigenschaften
- 10 zu verleihen, die ein Haften am geronnenen Blut verhindern, so dass der Verband leichter von der verkrusteten Wunde gelöst und entfernt werden kann. Glycerin wird in einer Konzentration von 10 bis 50 Volum-%, vorzugsweise etwa 30 v/v der Gerinnungslösung verwendet.
- 15 Die Zugabe von Polyethylenglykol ist nicht zwingend, ist jedoch zweckmässig. Es wird in einer Menge von 0,01 bis 4 Gew.-% der Gerinnungslösung verwendet. Bevorzugt wird ein Polyethylenglykol mit einem Molekulargewicht im Bereich von 2500 bis 6000.
- 20 Bei einer bevorzugten Ausführungsform einer Gerinnungslösung werden Polyethylenglykol mit einem Molekulargewicht von etwa 6000 in einer Menge von 0,2 % oder 0,2 g/100 ml, bezogen auf die Gerinnungslösung, zu der Salzlösung zusammen mit Lysin 0,05 molar und 6500 Internationale Einheiten Thrombin pro
- 25 100 ml Gerinnungsmittel zugegeben. Glycerin wird in einer Menge von etwa 30 Volumteilen der Lösung zugefügt. Bei einer solchen Lösung wirken Lysin, Glycerin und Polyethylenglykol - jedes für sich - als Protein-Konservierungsmittel und es
- essentl. besser. konservierende Wirkung auf die Wirksamkeit des Thrombin ausüben.

Thrombin in einer Salzlösung ist über längere Zeiträume stabil, wenn die Lösung bei Temperaturen von 2° bis 8° C aufbewahrt wird. Vom praktischen Standpunkt aus gesehen ist es aber sehr schwierig, die Möglichkeit auszuschliessen, oder zu verhindern, dass eine vorgefertigte Thrombinlösung 5 Zimmertemperaturen oder gar höheren Temperaturen ausgesetzt wird. Es ist beispielsweise unvermeidlich, dass die Gerinnungslösung, wenn sie vom Hersteller versandt wird, gegebenenfalls über einen Feiertag oder ein Wochenende in einem 10 ungekühlten Transportwagen oder auf einer Verladerampe stundenlang in der Sonne liegt. Wenn durch Wärmeeinwirkung entaktiviertes Thrombin vor der Verwendung nicht festgestellt oder erkannt wird, wird das Versagen des Mittels dem Hersteller angelastet. Es ist daher das Bestreben der Erfindung, 15 Thrombinlösungen zu schaffen, die gegenüber Wärmebedingungen, die während des Transports auftreten können, widerstandsfähig sind und nicht unwirksam werden. Mit anderen Worten, die erfindungsgemässen Zubereitungen der Gerinnungsmittel sollen über längere Zeiträume, d.h. Monate, bei Zimmertemperatur 20 stabil und aktiv bleiben.

Versuche haben gezeigt, dass das wesentliche Stabilisierungs- oder Konservierungsmittel das Benetzungsmittel aus mehrwertigem Alkohol ist. Die Aminosäure stabilisiert das Thrombin in einem geringen, aber summierenden Ausmass. Ob das Polyethylenglykol zu der thermischen Stabilität etwas beiträgt, ist 25 nicht sicher, aber dennoch wird die Zugabe dieses mehrwertigen Alkohols als erwünscht und zweckmässig angesehen.

Auf jeden Fall wurde gefunden, dass die erfindungsgemässen

Bei 37° C werden die Thrombin-Salzlösungen innerhalb weniger Tage unwirksam. Die erfindungsgemässen Lösungen dagegen sind (thermisch) ausreichend stabil, um in Fertigpakungen, wie absorbierende Kompressen, Verbandmull, Bandagen und dergleichen Verbandzeug, von der Herstellungsstätte bis zu den üblichen Verkaufskanälen verteilt zu werden.

Zur Herstellung der Gerinnungsmittel-Zubereitung wird das Natriumchlorid bei Zimmertemperatur in sterilem Wasser (entionisiert und destilliert) in der gewünschten Konzentration gelöst. Dann wird etwas von der Salzlösung zum Vorlösen des Thrombin verwendet, das üblicherweise in Pulverform vorliegt. Mehr von der Salzlösung und alle der verwendeten mehrwertigen Alkohole werden dann gemischt und in diese Mischung wird die Thrombinlösung eingemischt. Dann wird die gesamte (pulverförmige) Aminosäure, beispielsweise Lysin, und - falls verwendet - das gesamte (feste) Polyethylenglykol in einer Einwaage auf der (endgültigen) Volumenbasis so lange zugegeben und gemischt, bis alle Bestandteile gelöst sind. Anschließend wird mit Salzlösung auf das Endvolumen der Gerinnungsmittel-Zubereitung aufgefüllt.

Danach wird die Lösung auf eine Bandage 10 (Fig. 1) aufgebracht und mit der Lösung sorgfältig gesättigt. Die Bandage kann beispielsweise aus einer Lage oder mehreren Lagen Gaze-Streifen 12 bestehen, die in eine poröse Kunststoff-Folie 13 in herkömmlicher Weise eingelegt sind. Die Bandage, Kompressen oder der Verbandmull wird dann in einer Papierhülle 14 versiegelt, die ein Folienfutter 15 und eine Innenbeschichtung 16 aus einem Polyethylenfilm aufweist. Die innere Polyethylen-

geschlossene Verbandzeug, fest abgedichtet ist. Eine so

verpackte Bandage wird bei kühler Temperatur, vorzugsweise 2° bis 8° C gelagert.

Die Verfahrensstufen zur Herstellung der Lösung sind in Fig. 2 veranschaulicht.

- 5 Fig. 3 ist eine graphische Darstellung, die anhand von Kurven die Wirksamkeit der Lösung bei der Blutgerinnung zeigt und zwar aufgrund von Stabilitätstests der Gerinnungslösungen, in denen Thrombin erfindungsgemäss mit verschiedenen Konser-
- 10 vierungsmitteln kombiniert ist. Die durchgeführten Versuche zeigen die oben beschriebenen Mengenverhältnisse, d.h. Thrombin in Mengen von 50 bis 2000 Einheiten pro ml Lösung und der mehrwertige Alkohol in Mengen von 50 Gew.-Teilen, bezogen auf die Gerinnungslösung. Eine Menge von beispielsweise mehr als 50 Teilen Glycerin in der Gerinnungslösung neigt zu extrem hoher
- 15 Viskosität oder Dickflüssigkeit und scheint die Kontaktwirkung zu verzögern. Das heisst, das Thrombin als Gerinnungsmittel ist dem Fibrinogen weniger zugänglich. Bei weniger als 10 Teilen Glycerin in der Lösung geht dessen konservierende Wirkung verloren oder wird merklich verringert.
- 20 Es ist bereits erwähnt worden, dass die Aminosäure in einer Menge von 0,01 molar bis 0,25 molar verwendet wird. Bevorzugt werden Lysin, Glycin und Isoleucin. Das Polyethylen ist in der Gerinnungslösung in einer Menge von 0,01 bis 4,0 Gew.-% vorhanden.
- 25 Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele anhand unterschiedlicher Zusammensetzung der Gerinnungslösung näher erläutert. Die relativen Mengenanteile sind entweder in Prozenten der Konzentration oder Volumengewicht angegeben.

aus den Beispielen 1 bis 6 erhalten wurden, sind in Fig. 3 aufgezeichnet. Die Mengenanteile und Versuchsbedingungen für diese Beispiele 1 bis 6 wurden so gewählt, dass nahezu ideale



Ergebnisse erzielt werden, die als Beweis für die erfindungs-  
gemäss erreichbaren Ergebnisse dienen. Bevorzugte Zubereitungen  
sind in Beispiel 8 beschrieben.

#### Beispiel 1

- 5 Es wurde eine Gerinnungslösung aus folgenden Bestandteilen  
hergestellt:

	<u>Bestandteile</u>	<u>pro 100 ml</u>
	Thrombin	1500 Einheiten
	Lysin	0,1 molar
10	Polyethylenglykol	0
	Glycerin	30 Volumteile
	Salzlösung	0,95 % NaCl-Konzentration (Restmenge)

- Die Bestandteile wurden sorgfältig miteinander gemischt, in  
15 eine Ampulle gegeben und in dieser bei einer Temperatur von  
40° C gelagert, um die Stabilität durch einen beschleunigten  
Stabilitätstest zu ermitteln. Aus der Kurve in Fig. 3 ist das  
Ergebnis der beschleunigten Stabilitätstests nach 60 Tagen  
Lagerzeit bei 40° C ersichtlich. Das Thrombin in der Lösung  
20 blieb stabil und behielt die Fähigkeit, Blut innerhalb we-  
niger als 10 Sek. zur Gerinnung zu bringen. Der beschleunigte  
Test entspricht einer Lagerzeit von acht (8) Monaten bei Zim-  
mertemperatur oder zwölf (12) Monaten bei 4° C. Die Ergebnisse  
der beschleunigten Stabilitätstests für die Gerinnungslösungen  
25 aus den Beispielen 1 bis 5 sind in Fig. 3 veranschaulicht.

#### Beispiel 2

3122926<sub>16</sub> -

10.08.81

	<u>Bestandteile</u>	<u>pro 100 ml</u>
	Thrombin	1500 Einheiten
	Lysin	0,05 molar
	Glycerin	30 Vol.-Teile
5	Polyethylenglykol	0
	Salzlösung	0,95 % NaCl Konzentration (Restmenge)

Die Bestandteile wurden sorgfältig gemischt und eine absorbierende Komresse wurde mit der Lösung gesättigt. Die Kom-  
 10 presse wurde, wie beschrieben, gebrauchsfertig verpackt und versiegelt. Es scheint, dass bei Fehlen von Polyethylenglykol geringere Mengen Lysin die Stabilität und Gerinnungswirkung der Lösung herabsetzen.

### Beispiel 3

15 Es wurde eine Gerinnungslösung aus folgenden Bestandteilen hergestellt:

	<u>Bestandteile</u>	<u>pro 100 ml</u>
	Thrombin	1500 Einheiten
	Lysin	0
20	Polyethylenglykol	(6000 mw.) 0,2 g
	Glycerin	30 Vol.-Teile
	Salzlösung	0,95 % NaCl Konzentration (Restmenge)

Die Bestandteile wurden, wie beschrieben, sorgfältig ge-  
 25 mischt und mit der Lösung eine absorbierende Komresse imprägniert und gesättigt. Das so vorbereitete Verbandzeug wurde ge-

Minderung der Stabilität angezeigt wurde.

3122926

- 17 -

10.08.81

Beispiel 4

Es wurde eine Gerinnungslösung aus folgenden Bestandteilen hergestellt:

	<u>Bestandteile</u>	<u>pro 100 ml</u>
	Thrombin	1500 Einheiten
5	Lysin	0,1 molar
	Glycerin	30 Vol.-Teile
	Polyethylenglykol	0,2 g
	Salzlösung	0,95 % NaCl Konzentration (Restmenge)

- 10 Die Bestandteile wurden sorgfältig gemischt, mit der hergestellten Lösung wurde eine absorbierende Kompresse gesättigt und danach gebrauchsfertig verpackt und versiegelt. Durch die Anwesenheit von Lysin und Polyethylenglykol wurde die Stabilität verbessert und die Lagerzeit erheblich verlängert.

15 Beispiel 5

Es wurde eine Gerinnungslösung aus folgenden Bestandteilen hergestellt:

	<u>Bestandteile</u>	<u>pro 100 ml</u>
	Thrombin	1500 Einheiten
20	Lysin	0,5 molar
	Glycerin	30 Vol.-Teile
	Polyethylenglykol	0,2 pro ml
	Salzlösung	0,9 % NaCl Konzentration (Restmenge)

- 25 Die Bestandteile wurden in üblicher Weise sorgfältig mitein-

- fertig verpackt und versiegelt. Trotz der Verringerung des Lysinanteils war die Stabilität der Lösung ausgezeichnet, wie der beschleunigte Stabilitätstest zeigte.
- 30

10.06.81

Beispiel 6

Es wurde eine Gerinnungslösung aus folgenden Bestandteilen hergestellt:

	<u>Bestandteile</u>	<u>pro 100 ml</u>
5	Thrombin	1500 Einheiten
	Lysin	0,05 molar
	Glycerin	0
	Polyethylenglykol	0,2 g pro ml
	Salzlösung	0,90 % NaCl Konzentration
10		(Restmenge)

Die Ergebnisse des beschleunigten Alterungstests waren im wesentlichen die gleichen wie bei der Gerinnungslösung in Beispiel 3, dargestellt in der Kurve III der Fig. 3.

Beispiel 7

- 15 Eine gebrauchsfertige Bandage gemäss Fig.1 wurde in eine Gerinnungslösung aus Beispiel 5 getaucht, bis die Bandage vollständig getränkt und gesättigt war. Als Beispiel ist eine Bandage aus einer Telfa-Kompresse von einer Grösse 5,08 cm x 7,62 cm x 0,1 cm verwendet worden. Die Kompresse enthielt
- 20 folgende Bestandteile:

	Thrombin	- 2 als 25,83 Einheiten/cm <sup>3</sup>
	Polyethylenglykol	- 2 als 516 mikrogramm/cm <sup>3</sup>
	Glycerin	- 2 als 77 mikroliter/cm <sup>3</sup>
	Lysin	- 2 als 2,36 mg/cm <sup>3</sup>
25	(Monohydrochlorid)	

Die genannten Konzentrationen pro cm<sup>3</sup> basieren auf der gleichmässigen Verteilung in der Telfa-Kompresse.

Beispiel 8

Die folgende bevorzugte erfindungsgemässe Zubereitung wurde wie in Beispiel 1 hergestellt und es wurden damit Bandagen und dergleichen Verbandzeug wie in Beispiel 7 imprägniert.

5	<u>Bestandteile</u>	<u>Mengenanteile</u>
	Wasser	70 Vol.-Teile
	Glycerin	30 Vol.-Teile
	L-Lysin (Monohydrochlorid)	0,913 g/100 ml und Lösung (0,05M
10	Natriumchlorid	0,9 g/100 ml Lösung
	Polyethylenglykol 6000 MG	0,2 g/100 ml Lösung
	Rinder-Thrombin (Parke-Davis)	6500 Int. Einheiten/100 ml Lösung.
15	Ein bevorzugter Thrombin-Bereich zum Imprägnieren von Kompressen, wie Telfa-Kompressen, ist 100 bis 125 Int. Einheiten pro Komresse.	

Beispiel 9

- 20 Es wurden eine Reihe von Untersuchungen bei 2° bis 8° C und bei 37° C durchgeführt, wobei die Zubereitungen aus Beispiel 8 verwendet wurden, wenn nichts anderes gesagt ist. Dabei wurden verschiedentlich Mannit und Sorbit anstelle von Glycerin sowie Isoleucin und Glycin anstelle von L-Lysin verwendet und Polyethylenglykol und Aminosäure weggelassen.
- 25 Die Kontrollversuchsreihen, dh. Thrombin in Salzlösung, wurden bei 37° C innerhalb etwa eines Tages entaktiviert, aber bei 2° bis 8° C wurde nach 75 Tagen noch kein wesentlicher Verlust der Wirksamkeit festgestellt, wobei die Gerinnungszeit
- bestimmt wurde. Diese Versuchsreihen bestätigten die Stabilität von Thrombin in Lösung bei tiefen Temperaturen.

10.05.81

Salzlösungen, Thrombin mit 0,05 M Glycin oder Isoleucin, aber ohne Polyethylenglykol (PEG) oder Benetzungsmittel, untersucht bei 37° C, zeigten eine gewisse Erhöhung der Stabilität. Sie waren alle etwa 10 Tage stabil, ohne Verlust  
5 der Wirksamkeit. Danach sank aber die Wirksamkeit sehr schnell und alle Lösungen waren innerhalb von 40 Tagen vollkommen wirkungslos. Bei diesen Kontrollversuchen waren Isoleucin und Glycin etwas besser als das L-Lysin.

Thrombin-Salzlösungen (ohne PEG und ohne Aminosäure) mit 15 %  
10 Mannit, oder 30 % Glycerin, oder 30 % Sorbit zeigten eine anhaltende Thrombin-Wirksamkeit, wobei diese 40 Tage (Sorbit) und bei einigen Versuchen 75 Tage (Glycerin und Mannit) anhielt. Vergleichslösungen mit 0,2 % PEG und 0,05 M Lysin zeigten ebenfalls eine Stabilität für mindestens 40 Tage,  
15 beide bei Zimmertemperatur und bei 37°C.

Salzlösungen, die Thrombin, 0,2 %PEG, 30 % Glycerin und entweder 0,05 M L-Lysin oder Isoleucin oder Glycin enthielten, zeigten noch nach einer Lagerzeit von mindestens 120 Tagen, bei Zimmertemperatur und 37° C Gerinnungswirkung.

20 Das in den Beispielen verwendete Thrombin war eine Proteinsubstanz von Rindern. Das handelsübliche Präparat enthielt für 10 000 Einheiten Thrombin etwa 180 bis 200 mg Thrombin-Pulver; 17,4 ml Natriumchlorid; 15,6 ml Calciumchlorid; 19 ml Glycin und 0,2 ml Benzethoniumchlorid.

25 Nach der Fertigstellung der Verpackung, einschließlich Versiegelung, können die gesättigten Kompressen, Bandagen und

zu lagern, um die Lebensdauer der Lösung zu verlängern, insbesondere die Wirksamkeit des Thrombin so lange wie möglich zu erhalten. In jedem Fall kann die Wirkung der Gerinnungslösung bestimmt werden, wenn die Packung geöffnet wird. Wenn  
5 die Lösung getrocknet ist, wirkt das Thrombin nicht zufriedenstellend als Gerinnungsmittel.

Die graphische Darstellung in Fig. 3 zeigt die deutliche Verlängerung der Lebensdauer von Thrombin, wenn es entsprechend der Beispiele 1, 4 und 5 behandelt ist. Beschleunigte Untersuchungen bei 40° C zeigen, dass die obengenannten Zubereitungen dem Thrombin Stabilität verleihen, die vergleichbar  
10 ist einer Lebensdauer von mindestens 8 Monaten bei Zimmertemperatur (+ 22° C) oder von mindestens 12 Monaten bei kühlen Temperaturen (2° bis 8° C). Die beschleunigten Untersuchungen  
15 bei 40° C zeigen auch, dass die Stabilität des Thrombin-Moleküls summierend erhöht wird, wenn alle drei Bestandteile, nämlich Glycerin, Polyethylenglykol (PEG) und die schwefelfreie ätherische Aminosäure verwendet werden. Wenn das wahlweise zuzugebende PEG gelassen wird, sollte der Aminosäuregehalt  
20 in der Zubereitung mindestens doppelt so gross sein wie in der bevorzugten Zusammensetzung (also statt 0,05 molar zu 0,1 molar), um eine entsprechende Stabilität des Thrombin ohne Polyethylenglykol aufrechtzuerhalten.

Es wurde gefunden, dass die fertigverpackte Protein-Gerinnungslösung nicht nur ein hochwirksames Mittel ist, um  
25 aufgebracht auf eine Wunde, das Blut zum Gerinnen zu bringen, sondern dass damit auch zeitraubende und kostspielige Mischvorgänge und Zubereitungsarbeiten vermieden werden, die ansonsten erforderlich wären, um das Gerinnungsmittel für den

3122926

10.05.81

- 22 -

Lebensdauer der erfindungsgemässen Gerinnungslösungen ausreichend, um die Wirksamkeit des Mittels nach einer längeren Lagerzeit sicherzustellen. Aufgebracht auf eine Wunde ist das Thrombin auch dann wirksam, wenn es nur in geringen Mengen  
5 in einer verdünnten Lösung vorhanden ist, wenn der Patient einen normalen Fibrinogen-Kreislauf hat.